

ВЛИЯНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ОРТОФОСФАТА НА ДИНАМИКУ НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО БЕЛКА В КУЛЬТУРЕ ХЛОРЕЛЛЫ (*CHLORELLA VULGARIS*)

И.А. Ильючик, А.И. Лакишик, В.Н. Никандров

Полесский государственный университет, Пинск

Введение. В последние десятилетия с переходом животноводства на промышленную основу остро встала проблема дефицита белка в рационах сельскохозяйственных животных.

Микроводоросли, в том числе рода *Chlorella*, стали его альтернативным источником с множеством преимуществ по сравнению с обычным сельскохозяйственным сырьем. По качеству продуцируемых белка и витаминов хлорелла превосходит все известные кормовые и пищевые продукты. Содержание общего белка в ее клетках составляет 42–58% от сухой биомассы (около 20% из них связаны с клеточной стенкой, более 50% – внутриклеточные и 30% – мигрирующие) и изменяется в зависимости от роста и условий культивирования [1].

В настоящее время более чем в 60 странах мира, в том числе в США, Мексике, Таиланде, Индии, Китае, Японии, Канаде и Австралии, производят в промышленных масштабах свыше тысячи тонн в год биомассы микроводорослей [2].

Основным преимуществом использования микроводорослей в качестве сырья, среди которых и зеленые протококковые рода хлорелла (*Chlorella*), является высокая скорость их воспроизводства, способность накапливать значительное количество белков, углеводов, жиров, витамины. При оптимальном поступлении питательных веществ они способны за сутки удваивать биомассу [3].

Интенсификация процессов производства так называемого «одноклеточного белка», в том числе и одноклеточными водорослями, составляет важную задачу биотехнологии.

Условия культивирования хлореллы и состав питательной среды оказывают существенное влияние на рост культуры и физиолого-биохимические свойства клеток. Так, при температуре 29 ± 1 °C и барботаже культуры хлореллы воздухом со скоростью 5,0 л/ч накопление биомассы и белка культурой существенно отличалось от такового в условиях 25 ± 1 °C и барботаже со скоростью 25 л/ч в присутствии хлорида марганца (0,01–137,50 мг/л). Кроме того, при более высокой температуре и сниженной аэрации наблюдалось явление хлороза клеток хлореллы [4, 5].

Одним из жизненно необходимых для всех живых организмов элементов является фосфор. Водоросли используют фосфор преимущественно в форме ортофосфатов. Их концентрация в питательной среде заметно изменяет рост и метаболизм водорослей [6].

При недостатке фосфора у хлореллы снижается скорость поглощения кислорода, изменяется активность ферментов клеточного дыхания. В условиях фосфорного голодания активируются процессы распада фосфоросодержащих биомолекул и полисахаридов, тормозится синтез белков и свободных нуклеотидов, наблюдается репрессия фотосинтеза. Избыток фосфора приводит к ускоренному развитию микроводорослей, они быстро стареют [7].

Фосфор в различных концентрациях на среде BG11 заметно влиял на рост, содержание первичных и вторичных метаболитов микроводоросли *Scenedesmus obliquus*, а также на его гипохолестериемическую способность, антиоксидантную и антибактериальную активность [8].

Однако в литературе практически отсутствуют конкретные данные о влиянии уровня ортофосфатов в питательной среде на накопление внутриклеточного белка. В литературе отсутствуют и конкретные материалы об изменениях физиолого-биохимического состояния клеток культуры *Chlorella vulgaris* при отсутствии в питательной среде источника фосфора.

В связи с этим целью настоящей работы явилось выяснение влияния уровня неорганического ортофосфата в питательной среде на накопление биомассы и внутриклеточного белка в культуре *Chlorella vulgaris*.

Материалы и методы. Исследования выполнены на культуре *Chlorella vulgaris*, штамм *IBCE C-19* из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

Хлореллу выращивали в условиях периодической культуры на среде Таммийя [9] при различной концентрации ортофосфата. Один вариант – среда Таммийя, не содержащая фосфора (в виде KH_2PO_4); в четырех вариантах концентрация ортофосфата составляла 0,892 г/л (оригинальный состав среды Таммийя, его принимали за контроль), 1,114, 1,336 и 1,784 г/л. Уровень азота во всех перечисленных вариантах среды соответствовал 0,693 г/л. Еще в одном опытном варианте питательной среды при концентрации фосфата 1,784 г/л уровень азота увеличивали в 1,75 раза – до 1,213 г/л (в среду добавлен карбонат аммония).

Микроводоросль культивировали при температуре 25 ± 1 °С, непрерывном перемешивании суспензии воздухом со скоростью 25 л/ч в течение 21 суток, освещенности на поверхности сосуда – 5000 лК, продолжительности световых и темновых фаз – 12ч/12ч.

Посевная доза равнялась $2,73 \pm 0,12$ млн/мл клеток. Концентрацию клеток хлореллы определяли с помощью камеры Горяева. На 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 и 21-е сутки отбирали аликвоты культуры, содержащие по $10,00 \pm 0,08$ млн клеток, клетки отделяли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 мин, трижды отмывали от культуральной жидкости дистиллированной водой.

Клетки хлореллы разрушали в фарфоровой ступке с измельченным стеклом и мелом как описано [9] при 4 °С в 500 мкл бидистиллированной воды. Полученный гомогенат использовали для определения концентрации общего белка в клетках колориметрическим методом [10].

Все исследования выполнены девятикратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы *Statistica 6.0* с вычислением *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. Культивирование хлореллы на среде Таммийя оригинального состава сопровождалось ростом биомассы водоросли с максимумом на 11-е сутки – увеличение в сравнении с началом культивирования составило 4,7 раза (таблица 1, рисунок). Далее культура переходила в стационарную фазу.

Эта картина отличается от описанной нами ранее, когда хлореллу выращивали на указанной среде, но без ЭДТА [5]. В том случае наблюдалась динамика изменения концентрации клеток водоросли, носящая практически прямолинейный характер, вплоть до 22-х суток.

Концентрация внутриклеточного белка достигала максимума к этому же времени. По сравнению с началом культивирования она увеличивалась в 3,9 раза (таблица 2, рисунок).

Таблица 1. – Динамика уровня биомассы культуры хлореллы (концентрация клеток, млн/мл) при различной концентрации ортофосфата, $n = 9$

Сутки	Концентрация ортофосфата, г/л					
	0,892 (контроль)	0	1,114	1,336	1,784	1,784 ^(a)
1	2,63±0,06	2,27±0,17	2,24±0,09*	3,07±0,08*	2,36±0,01	2,75±0,17
3	3,25±0,13	2,65±0,09*	2,51±0,14*	3,91±0,12*	3,34±0,02	2,13±0,08*
5	6,31±0,04	2,54±0,04*	3,01±0,03*	5,00±0,07*	3,91±0,04*	2,27±0,09*
7	7,56±0,06	5,19±0,12*	2,95±0,02*	5,35±0,15*	7,92±0,02	4,11±0,03*
9	12,06±0,09	4,50±0,16*	4,95±0,19*	9,88±0,11*	10,21±0,06*	3,24±0,03*
11	12,38±0,10	3,57±0,01*	5,00±0,11*	9,52±0,02*	8,97±0,11*	5,15±0,07*
13	11,64±0,07	4,10±0,03*	8,09±0,06*	10,22±0,08	11,08±0,11	4,99±0,06*
15	11,55±0,12	3,50±0,11*	7,77±0,12*	7,98±0,09*	11,72±0,04	6,37±0,12*
17	11,54±0,11	3,73±0,06*	9,70±0,01*	9,76±0,05*	11,73±0,04	4,71±0,11*
19	11,08±0,04	2,94±0,08*	5,76±0,06*	7,96±0,02*	11,82±0,05	5,12±0,02*
21	10,49±0,07	2,81±0,06*	5,23±0,07*	6,11±0,01*	12,91±0,02*	4,13±0,01*

Примечание – Здесь и далее –* – данные статистически достоверны при $P \leq 0,05$; (a – концентрация азота в среде – 1,213 г/

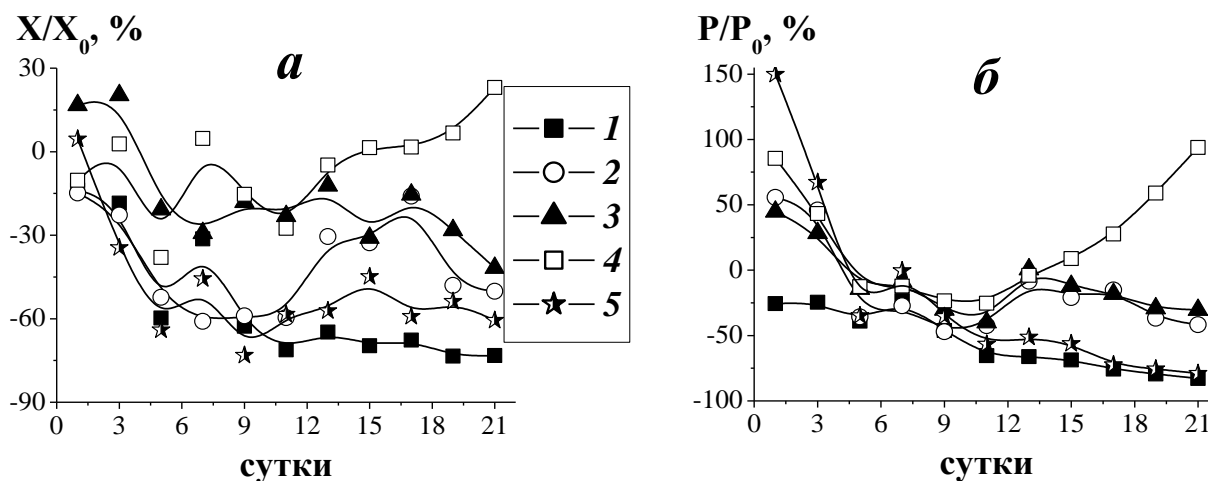


Рисунок – Изменения (% к контролю, принятому за 100%) уровня биомассы (а), содержания внутриклеточного белка (б) культуры хлореллы при различной концентрации KH_2PO_4 в питательной среде (г/л): 1 - 0; 2 – 1,114; 3 – 1,336; 4 – 1,784; 5 -1,784 с добавлением карбоната аммония

Как и следовало ожидать, отсутствие в питательной среде ортофосфата подавляло рост культуры. При всей кажущейся очевидности этих фактов, в литературе отсутствуют конкретные сведения о функционально-биохимических изменениях культуры *Chlorella vulgaris* при отсутствии в питательной среде источника фосфора. Максимум увеличения биомассы в этих условиях проявился уже на 7-е сутки и составил 2,3 раза в сравнении с началом культивирования, а по отношению к контролю урожай биомассы снижался на 31,3%.

Начиная с 9-х суток, концентрация клеток в этом варианте отставала от контроля на 63–73%. Максимальный уровень внутриклеточного белка проявился также на 7-е сутки. Однако прирост его в сравнении с 1-ми сутками не превысил 2,7 раза, а в сравнении с

контрольным вариантом он был меньше на 23%. В целом же, в последующий период удаление источника фосфора из питательной среды приводило к падению уровня внутриклеточного белка на 46–83% по отношению к контролю.

Увеличение концентрации в питательной среде ортофосфата до 1,336 г/л, в целом, подавляло рост культуры хлореллы. Наиболее демонстративно это проявилось при концентрации ортофосфата 1,114 г/л: в период 7–11 сутки в сравнении с контролем уровень биомассы был ниже на 60%. Максимум роста биомассы в сравнении с началом культивирования в этих вариантах составил 4,3 и 3,3 раза соответственно.

Вместе с тем, в первые трое суток при этих концентрациях ортофосфата заметно – на 28–56% нарастал уровень внутриклеточного белка. Однако в последующие сроки этот эффект сменялся падением величины данного показателя.

Картина существенно менялась при дальнейшем обогащении питательной среды ортофосфатом до 1,784 г/л. Прирост биомассы в этом случае отмечен на всем протяжении культивирования. Причем, в сравнении с началом культивирования, уровень ее возрастал в 5,5 раз, а начиная с 15 суток не отличаясь от контрольного варианта, превосходил в конце процесса таковой на 23%, не уступая его максимальному уровню (таблица 1). Вместе с тем, в период 17–21 суток уровень внутриклеточного белка превышал показателя контроля на 28–94% (таблица 2, рисунок).

Таблица 2. – Изменения содержания внутриклеточного белка культуры хлореллы (мкг/мл млн клеток) при различной концентрации ортофосфата, $n = 9$

Сутки	Концентрация ортофосфата, г/л					
	0,892 (контроль)	0	1,114	1,336	1,784	1,784 ^(a)
1	20,12±0,02	14,98±0,04*	31,33±0,02*	29,14±0,01*	37,33±0,01*	50,27±0,02*
3	26,17±0,01	19,75±0,01*	38,21±0,03*	33,62±0,03*	37,53±0,01*	43,75±0,02*
5	45,31±0,01	27,66±0,01*	29,14±0,04*	38,87±0,04*	39,62±0,01	29,51±0,02*
7	49,90±0,01	38,22±0,01*	36,29±0,05*	45,63±0,03*	43,86±0,02	49,70±0,02
9	73,86±0,01	39,71±0,02*	39,14±0,04*	51,53±0,04*	56,52±0,01*	47,66±0,01*
11	77,50±0,01	26,79±0,01*	44,59±0,04*	46,56±0,04*	57,87±0,00*	33,62±0,03*
13	62,12±0,02	21,00±0,04*	56,89±0,03	62,50±0,02	59,65±0,00	30,29±0,02*
15	58,67±0,01	18,34±0,01*	46,36±0,02*	51,62±0,03	63,86±0,01	25,69±0,01*
17	56,25±0,01	13,65±0,02*	47,72±0,01*	46,04±0,02*	71,82±0,00*	15,55±0,02*
19	56,08±0,01	11,56±0,01*	35,43±0,02*	39,71±0,02*	89,17±0,01*	13,71±0,03*
21	51,70±0,02	8,84±0,01*	30,17±0,01*	35,98±0,03*	100,2±0,01*	10,99±0,01*

Дополнительное же обогащение питательной среды источником азота при этой концентрации ортофосфата негативно сказывалось на росте культуры. Практически за весь период наблюдения концентрация клеток была на 34–73% ниже, чем в контрольном варианте. Примечательно, что в первые трое суток уровень внутриклеточного белка превышал контрольный вариант на 67–150%.

Как мы уже отмечали, в литературе практически отсутствуют конкретные данные о роли фосфатного питания *Chlorella vulgaris* в содержании внутриклеточного белка. В одной из последних публикаций, касающихся хлореллы, установлено, что небольшой избыток фосфора в питательной среде BG11 (≤ 45 мг/л, в классической среде – 5,4 мг/л) при лимитирующей концентрации источника азота – NaNO_3 300 мг/л (20% от классической среды BG11) стимулировал рост клеток *Chlorella regularis* var. *minima*, вызывая увеличение ее биомассы на 10,2%, уровня липидов на 39,3%, активность митохондрий на 25,0%. В относительно высокой концентрации фосфора (250 мг/л) отмечено подавление роста клеток данной культуры на 38,8%, активности митохондрий на 71,3%. При этом наблюдались увеличение размеров клеток, плазмолиз, деформация клеточных стенок и дезорганизация

органелл [11]. Однако какой-либо информации об уровне внутриклеточного белка авторы не приводят.

Все упомянутые в нашей статье источники литературы дают основание полагать, что фактически приведенные нами экспериментальные данные характеризуют эту сторону действия неорганического ортофосфата на культуру одноклеточной зеленой водоросли впервые. При этом обращает на себя внимание действие максимальной концентрации фактора.

Заключение. Изложенные данные демонстрируют существенное влияние уровня неорганического ортофосфата в питательной среде на урожай биомассы *Chlorella vulgaris* и содержание внутриклеточного белка. Складывается достаточно сложная и неоднозначная картина, на первый взгляд, свидетельствующая о том, что увеличение концентрации неорганического ортофосфата чревато угнетением роста культуры *Chlorella vulgaris* и снижением уровня внутриклеточного белка. Получается, что оригинальная среда Таммийя дает оптимальные результаты в этом плане. Попытка увеличения концентрации азота, необходимого для синтеза аминокислот и белка, только ухудшила ситуацию. Однако это была «точечная» концентрация без проработки диапазона.

Более того, полученные сдвиги изученных показателей в отдельные периоды роста культуры позволяют думать, что дальнейшая проработка рассмотренного в статье вопроса может значительно улучшить результаты.

Список использованных источников

1. Abdulagatov, I. M. Microalgae as a Renewable Raw Material for Agriculture, Biofuel Production and Purification of Geothermal Water from Phenols / M. I. Abdulagatov [et al.] // Proceedings, 43rd Workshop on Geothermal Reservoir Engineering Stanford University, Stanford, California, February 12-14, 2018. SGP-TR-213.
2. Fradique, M. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: preparation and evaluation / M. Fradique, A.P. Batista, M.C. Nunes // J. Sci. Food Agric. – 2010. – № 90. – P. 1656 – 1664.
3. Сорокина, К.Н. Потенциал применения микроводорослей в качестве сырья для биоэнергетики / К.Н. Сорокина [и др.] // Катализ в промышленности. 2012. – №2. – С. 63–72.
4. Ильючик, И.А. Влияние $MnCl_2$ на физиолого-биохимические показатели клеток *Chlorella vulgaris* в состоянии хлороза / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Актуальная биотехнология: научный журнал. – 2018. – № 3 (26). – С. 390-395.
5. Ильючик, И.А. Рост культуры хлореллы (*Chlorella vulgaris*) и накопление белка при добавлении $MnCl_2$ в питательную среду / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук. – 2018. – № 1. – С. 53-64.
6. Minhas, A.K. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids / A.K. Minhas [et al.] // Frontiers Microbiology. 2016; 7: 546. Published online 2016 May 3. doi: [10.3389/fmicb.2016.00546](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546).
7. Упитис, В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В.В. Упитис. – Рига: Зинатне, 1983. – 240 с.
8. Hamouda, R. Influence of various concentrations of phosphorus on the antibacterial, antioxidant and bioactive components of green microalgae *Scenedesmus obliquus* / Ragaa Abd Elfatah Hamouda, Ghada Wagih Abou-El-Souod // PaInternational Journal of Pharmacology. – 2018. – Vol. 14. – № 1. – P. 99-107.
9. Сиренко, Л.А. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Л.А. Сиренко [и др.]; отв. ред. А. В. Топачевский; АН СССР, Ин-т гидробиологии. – Киев: Наукова думка, 1975. – 247 с.

10. Невмержицкая, Ю.Ю. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты): учебно-методическое пособие / Ю.Ю. Невмержицкая, О.А. Тимофеева. – Казань: Казанский университет, 2012. – 36 с.

11. Fu, L. Hormesis effects of phosphorus on the viability of *Chlorella regularis* cells under nitrogen limitation / Liang Fu [et al.] // Biotechnol. Biofuels. – 2019. – Vol. 12. – 121. Published online 2019 May 13. doi: 10.1186/s13068-019-1458-z.